

Aus dem Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Willy Schwarz

Das elektronenmikroskopische Bild der Rattendecidua nach Actinomycin-D-Gabe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gernot G. Stefan

aus Landskrön

1973

Aus dem Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Willy Schwarz

Das elektronenmikroskopische Bild der Rattendecidua nach Actinomycin-D-Gabe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gernot G. Stefan

aus Landskron

Referent: Professor Dr. med. Hans-Joachim Merker

Korreferent: Professor Dr. med. Ulrich Gross

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 16. Februar 1973

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung	1 - 7
Material und Methoden	8
Befunde	9 - 16
I. Normaler Nucleus der Decidua	9 - 12
II. Nucleolus der Decidua nach Actino- mycinbehandlung	13 - 16
Diskussion	17 - 25
Zusammenfassung	26 - 27
Literaturverzeichnis	28 - 40
Lebenslauf	
Bildanhang	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung

Die Decidua ist bei den häufig benutzten Ratten und Mäusen sehr stark ausgebildet und zeigt auch einen hohen Grad zytologischer Differenzierung (Villegas und Merker, 1970; Merker und Villegas, 1970; Köhler und Merker, 1972). Sie stellt in voller Entwicklung einen epithelartigen Verband dar, der sich durch Hyperplasie und Hypertrophie aus ortsständigen Zellen des subepithelialen Bindegewebes in der Umgebung der Nidationsstelle entwickelt (Deciduale Reaktion). Ihre Zellen zeigen aus morphologischer Sicht bei der Ratte besonders am 8. - 10. Tag charakteristische Merkmale stoffwechselaktiver Zellen (Möller, 1972; Merker und Villegas, 1970; Villegas und Merker, 1970; Köhler und Merker, 1972; Orsini et al., 1970; Wynn, 1965).

Die plumpen, großen Zellen haben Ähnlichkeit mit Leberparenchymzellen. Ihre großen, oft doppelt großen Kerne mit ihrem diffus verteilten Chromatin fallen besonders wegen der riesigen, aufgelockerten, aktiven Nucleoli auf. Solche Kerne und Nucleoli sind in anderen Zellarten verschiedener Tiere während heftiger Proteinsynthesevorgänge beschrieben worden (Flickinger, 1963; Jacob und Sirlin, 1964; Schoefl, 1964; Goldblatt et al., 1969; Goldblatt et al., 1970). Ein außerordentlich stark entwickeltes endoplasmatisches Retikulum der rauhen Form wurde ebenfalls in den Deciduazellen der Ratte nachgewiesen (Möller, 1972). Weiterhin zeigen sich hier zahlreiche Mitochondrien und ein großer Golgiapparat. Während der Deciduaentwicklung läßt sich die fast vollständige Auflösung der ursprünglichen ortsständigen Bindegewebsstruktur verfolgen. Die Auflösung wird wahrscheinlich durch Enzyme bewirkt, die in den Decidua-

zellen gebildet, in Granulaform gespeichert und dann in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Der extrazelluläre Raum wird dabei immer kleiner und ist am 10. Tag weitgehend verschwunden (Villegas und Merker, 1970; Möller, 1972). Ein charakteristisches morphologisches Merkmal der epithel-ähnlich gepackten Decidua-zellen ist darüberhinaus die enorme Adhaesion, besonders in der zona compacta. Auf weiten Strecken sind hier die Zellen durch zonulae occludentes (tight junctions) und close contacts verknüpft (Villegas und Merker, 1970; Möller, 1972), während im normalen lockeren Bindegewebe des Uterus, aus dem sich die Decidua entwickelt, kaum eine Berührung vorkommt. Trotz dieses ausgeprägten Adhäsionsverhaltens bleiben röhrenförmige Erweiterungen zwischen den Zellen offen, die den Gallenkapillaren in der Leber sehr ähnlich sind (Möller, 1972). Auf der Grundlage dieser morphologischen Befunde und anderer, auch klinischer Erfahrungen sind von der Decidua eine Reihe von Funktionen diskutiert worden (Merker und Villegas, 1970; Villegas und Merker, 1970; Möller, 1972; Amorso, 1952; De Feo, 1967; Finn und Mc Laren, 1967; Kirby, 1965; Starck, 1965; Shelesnyak und Tic, 1963).

- A. Vorbereitung der Einbettung und Schutz des Keimes
- B. Vorbereitung und Ermöglichung der Placentabildung
- C. Aufrechterhalten der Blutversorgung für den Keim und die sich entwickelnde Placenta
- D. Beteiligung an der Ernährung des Embryos
- E. Hormonsynthese
- F. Errichtung einer Immunbarriere
- G. Verhinderung eines kontinuierlichen und unkontrollierten Wachstums der Placenta

Besonders interessant scheint die Vorstellung von der

Beteiligung der Decidua an der Ernährung des Keimes. Diese Ernährung erfolgt bei der Ratte bis zum Tag 12 durch eine sog. histiotrophe Flüssigkeit. Während dieser Zeit besteht eine besonders konstruierte Verbindung zwischen dem decidualen Blutgefäßsystem und einem Hohlraumssystem um den Keim, dem Periembrionalen Sinus (PS). In der Nähe des PS verlieren die Gefäße ihren üblichen, kontinuierlichen Endothelbelag, und die bluthaltigen Räume werden durch die Deciduazellen mit ihren engen Kontakten abgedichtet. Bei Bedarf jedoch öffnen sich einige Verbindungen, und Blut kann in den PS eingepreßt werden (Villegas und Merker, 1970; Merker und Villegas, 1970; Möller, 1972). Alle Blutbestandteile können deshalb frei die Reichert'sche Membran als äußere Keimschicht erreichen.

Da die Reichert'sche Membran mit ihren Poren (Jolie, 1965) praktisch kein Hindernis darstellt, erreichen selbst große Moleküle, wie Antikörper, embryonales Gewebe (Merker und Villegas, 1970; Buettner, 1972; Brent, 1970). Der umgekehrte Weg (Keim - Mutter) ist dagegen offenbar durch die besondere Konstruktion der Decidua nicht möglich (Kirby, 1969; Villegas und Merker, 1970). Das viscerele Dottersackentoderm, an das die histiotrophe Flüssigkeit nach Passieren der Reichert'schen Membran anströmt, kann durch Phagozytose und Abbau die makromolekularen Substanzen der Histiotrophe einschmelzen. Diese Produkte werden für die Ernährung der embryonalen Zellen verwendet. (Müller, 1964; Merker und Villegas, 1970; Spors, 1971; Satow et al., 1966).

Die Morphologie der Deciduazellen mit den großen Kernen und Nucleoli, dem verstärkten rauen Endoplasmatischen Retikulum, dem großen Golgiapparat, den gehäuft vorkommenden Ribosomen und dem leberzellähnlichen Bild

deutet auf eine hohe Synthese- und Sekretionsrate von Proteinen hin. H.G. Müller fand 1964 durch autoradiographische Untersuchungen den Eiweißumsatz in den Deciduazellen 5 bis 10 mal höher als peripher davon. Da über die Natur dieser Proteine nichts bekannt ist, bietet sich die Vorstellung an, daß sie der Ernährung des Keimes während der Phase der histiotrophen Nutrition dienen (Möller, 1972). Wenn die Decidua aber an der Ernährung des Embryos durch Synthese von Protein beteiligt ist, müssen Störungen dieser Funktion auch Störungen der embryonalen Entwicklung bewirken. Wir halten aus diesen Gründen eine embryotoxische Wirkung durch eine Schädigung der Decidua für möglich.

Dieser Angriffspunkt einer embryotoxisch wirksamen Substanz ist bisher zur Erklärung von Mißbildungen und Keimschädigungen nur von Köhler et al. (1972), Rötz et al. (1972) und Merker et al. (1972) diskutiert worden. Diese Autoren sahen bei ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen mit Actinomycin und Methothrexat eine eigentümliche Diskrepanz zwischen hoher Embryotoxizität (Resorptionen und Mißbildungen), geringer morphologisch faßbarer Wirkung am Keim und ausgeprägten Veränderungen an der Decidua. Tatsächlich scheint - wie Köhler und Merker (1972) bereits beschrieben haben - Actinomycin besonders geeignet zu sein, die Vorstellung eines embryotoxischen Effektes über eine Wirkung an der Decidua zu erhärten. Von dieser Substanz ist sowohl eine RNS- und damit Proteinsynthesehemmung als auch eine embryotoxische Wirkung bekannt (Lit. siehe in Einzelheiten Köhler und Merker, 1972 und Diskussion). Actinomycin retardiert die Entwicklung des Keimes und verursacht Kopfmißbildungen, Veränderungen der Fruchthüllen, des Rumpfes, der Extremitäten und der Blutgefäße der Haut (Zimmermann und Gottschewski, 1965). Es ver-

hindert außerdem die Differenzierung (Tiedemann, 1965; Monesi et al., 1970), hemmt die Metamorphosenprozesse (Weber, 1965) und führt zu einer Hemmung der Zellteilung (Nachtwey und Dickinson, 1967). Über den eigentlichen biochemischen Wirkungsmechanismus des Actinomycins bestehen folgende Vorstellungen:

Actinomycin wird an das Guanin der DNS gebunden und blockiert so die Synthese von messenger-RNS, z.T. über die Hemmung eines DNS-abhängigen RNS-Polymerasesystems, während die DNS-Synthese relativ ungestört bleibt (Kersten et al., 1960; Bierling, 1960; Kirk, 1960; Goldberg et al., 1962; Hurwitz et al., 1962; Hartmann und Coy, 1962; Harbers und Müller, 1962; Reich et al., 1961; Reich et al., 1962; Perry, 1963; Ficq, 1964; Goldberg und Rabinowitz, 1962; Goldberg und Reich, 1964; Franklin, 1963; Reich und Goldberg, 1964; Müller und Crothers, 1968; Tiedemann, 1965; Simard und Bernhard, 1966; Kersten, 1961; Reich, 1963; Igarashi und Yura, 1969; De Vincentis und Lancieri, 1970). Auf die von einem Teil der Chromosomen gebildete chromatinähnliche RNS (extranucleoläre RNS) hat Actinomycin dagegen wohl keinen Einfluß (Perry, 1963). Die von der nucleolären Region der Chromosomen gebildete nucleoläre RNS, die die 18 S- und 32 S-RNS-Elemente für die Ribosomen liefert, wird aber durch Actinomycin stark beeinträchtigt. Infolgedessen wird ein größerer Teil der Cytoplasma-RNS, die in Ribosomenform vorliegt, deutlich verringert (Perry, 1963; Schoeßl, 1964; Girard et al., 1964; Rodriguez, 1967; Antley und Fox, 1970; Monesi et al., 1970). Die notwendige Folge dieser Wirkung ist ein Abfall der Eiweißsynthese um ungefähr die Hälfte (Goldblatt et al., 1970; Antley und Fox, 1970; Monesi et al., 1970).

Die Störung der RNS- und Eiweißsynthese nach Actinomycineinwirkung führt zu morphologischen Veränderungen, die bereits in verschiedenen Tierzellen beschrieben wurden (*Amoeba proteus*: Flickinger, 1968; Salivary Glandcells von *Smitta parthenogenetica*: Jacob und Sirlin, 1964; Salivary Glandcells von *Chironomus thummi*: Stevens, 1964; Baboon Nierenzellen: Schoefl, 1964; Exokrine Pankreaszellen der Ratte: Jézéquel und Bernhard, 1964; Exokrine Pankreaszellen der Maus: Rodriguez, 1967; Leberparenchymzellen der Maus: De Man und Noorduy, 1967; Goldblatt et al., 1969; Leber- und Intestinalzellen der Maus: Goldblatt et al., 1970; Leberzellen der Ratten: Stenram, 1965; Parotisdrüsen der Ratte: Han, 1967; Myeloblasten: Heine et al., 1966).

Nach Gaben von Actinomycin wurde elektronenmikroskopisch eine Segregation (sorting out) der verschiedenen Nucleoluskomponenten in Form von Kondensation der RNP-Granula, peripherer Abgrenzung der fibrillären Komponente und Aussonderung des amorphen Materials beschrieben (Schoefl, 1964; Jacob und Sirlin, 1964; Reynolds et al., 1964; Bernhard, 1966; Heine et al., 1966; Rodriguez, 1967; Goldblatt et al., 1969; Goldblatt et al., 1970; Jézéquel und Bernhard, 1964). Eine gleichzeitige Abnahme der Nucleolusgröße, zunehmende Verdichtung (Aggregation), Vakuolisierung und Fragmentation wurde ebenfalls beobachtet (Journey und Goldstein, 1961; Jacob und Sirlin, 1964; Schoefl, 1964; Stevens, 1964; Heine et al., 1966; Han, 1967; Stevens, 1967; Rodriguez, 1967). Darüberhinaus lassen sich fibrillär-granuläre Platten an den Ecken der Nucleolusmassen (Flickinger, 1968; Schoefl, 1964; Goldblatt et al., 1969; Goldblatt et al., 1970) und Blasen oder Knospen aus amorphem Material (Jacob und Sirlin, 1964; Schoefl, 1964; Rodriguez, 1967) darstellen.

Im übrigen Karyoplasma fand man vor allem lokale Verklumpung und Zertrümmerung des Chromatins (Schoeßl, 1964; Jacob und Sirlin, 1964).

Am Endoplasmatischen Retikulum können nach Actinomycinbehandlung Desorganisation, Fragmentation, Ablösung von Ribosomen und vesikuläre Umwandlung eintreten. Die Polysomen können disaggregieren und damit kann die Zahl der freien Ribosomen ansteigen (Schoeßl, 1964; Rodriguez, 1967; David, 1969; Reid et al., 1971).

Wenn die Decidua über die Synthese spezieller Proteine ernährend an der Entwicklung des Keimes beteiligt ist, müßte eine Störung dieser Funktion zu Ernährungsstörungen und damit embryotoxischen Effekten führen. Wenn aber Actinomycin die Proteinsynthese über eine Hemmung der RNS-Synthese stört, dann könnte wenigstens ein Teil der teratogenen Wirkung des Actinomycins über eine Beeinflussung der Decidua erklärt werden. Da die morphologische Erfassung einer Actinomycinwirkung an anderen Geweben gelingt, sollte eine ähnliche Wirkung auch an der Decidua zu erfassen sein. Tatsächlich konnten Köhler und Merker (1972) diesen Angriffspunkt des Actinomycin-D deutlich erfassen. Damit gewinnt die Vorstellung einer Mißbildungsentstehung über eine Deciduaschädigung an Bedeutung. Wir untersuchen deshalb zur Absicherung der Vorstellungen von Köhler und Merker (1972) an einem größeren Material die Feinstruktur der Decidua an Ratten (Tag 7 - 10 der Schwangerschaft) nach Gabe von Actinomycin.

Material und Methoden

Verwendet wurden Wistar Albino Ratten vom Stamm SW 69. Bei verschobenem Tag-Nachtrhythmus in temperatur- und feuchtigkeitsgeregelten Räumen wurden die üblichen Standardbedingungen der Zucht beibehalten. Um die Schwangerschaftsdauer festlegen zu können, wurden die Tiere zwischen 7³⁰ und 9³⁰ gepaart. Da etwa 80 % der Muttertiere gegen 8⁰⁰ spermienpositiv waren, wurde dieser Zeitpunkt als Schwangerschaftsbeginn festgesetzt = Tag 0 Stunde 0. Am Tag 8, 9, 10, 11 oder 12 der Schwangerschaft wurden 300 mg/kg Actinomycin-D intraperitoneal je Tier gespritzt und die Embryonen bzw. Embryo und Decidua nach 6, 12, 24 oder 48 Stunden entnommen und sofort fixiert. Im Fixierungsmittel erfolgte dann die weitere Zerkleinerung.

Die Fixierung erfolgte in einer modifizierten Karnovsky-Lösung, die aus 3 % Paraformaldehyd und 3 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) bestand. Die Fixierungsdauer betrug 3 Stunden. Die Nachfixierung erfolgte in einer 1 %-igen mit 0,1 M Cacodylat gepufferten OsO₄-Lösung, die Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe. Schließlich wurde in Mikropal (Ferah, Berlin) eingebettet.

Die Blöcke wurden mit einem Reichert-Fräsegerät unter stereomikroskopischer Kontrolle zugespitzt und die Schnitte an Reichert Ultramikrotomen sowie LKB Ultratome III hergestellt. Anschließend erfolgte die Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat (Reynolds). Die elektronenmikroskopische Betrachtung geschah mit Siemens Elmiskop I und Ia bei einer Strahlspannung von 80 kV. Der Vergrößerungsbereich lag zwischen 1000 und 30000. Die Auswertung wurde an 3 1/2 bzw. 4-fachen Nachvergrößerungen auf Positivpapier durchgeführt.

Befunde

Da über den genauen Aufbau des Nucleus der normalen Decidua in der Literatur nur die präzisen Angaben von Möller (1972) und Köhler und Merker (1972) zu finden sind, soll hier zum besseren Verständnis unserer Befunde nochmals eine genauere Beschreibung erfolgen:

I. Normaler Nucleus der Decidua

In den in unbehandelten Ratten sich mächtig entwickelnden Deciduazellen vom Tag 8 - 12 einer normalen Schwangerschaft sieht man elektronenmikroskopisch ein bis zwei Kerne von kugeliger bis ovaler Form, die sehr groß sind. Sie sind von einer Membran umhüllt, an der ~~undulierende~~ und gradlinige Teilstücke sowie tiefe Einstülpungen zu beobachten sind. In vielen Schnitten sind solche Einstülpungen zu finden, die, zuweilen fingerförmig gestreckt, fast die gegenüberliegende Kernmembran erreichen und einen nahezu kreisrunden Durchmesser von ungefähr 1μ aufweisen. Die Kernmembranen sind in Intervallen durch Poren unterbrochen, die einen Durchmesser von ungefähr $750 - 1500 \text{ \AA}$ haben. Die Distanz zwischen den Poren variiert, stellt aber auf jeden Fall ein Vielfaches des Porendurchmessers dar. Ein Ribosomenbesatz der äußeren Lamelle ist zu verzeichnen. An der inneren Lamelle finden wir regelmäßig etwa $0,05 - 0,2\mu$ breite Anlagerungen von elektronendichtem Material, die als sog. Randchromatin anzusehen sind.

Das übrige Karyoplasma erscheint aufgelockert. Es enthält nur wenige Chromatinverdichtungen, die, ziemlich diffus verteilt, als kleine Aggregate zu erkennen sind. Diese Verdichtungen finden sich besonders im Bereich des Nucleolus.

Die aufgelockerte Chromatinsubstanz enthält feinfilamentäres ($200 \text{ \AA}$) und feingranuläres Material in sonst amorpher Grundsubstanz. Da diese Strukturen sehr locker verteilt sind, erscheint der Kern hell, häufig sogar heller als das umgebende Cytoplasma mit seinen vielen Bestandteilen.

In den Kernen der Deciduazellen von Ratten der untersuchten Schwangerschaftsphasen treten besonders auffällig die Nucleoli hervor. Sie stellen sich als riesige Knäuel von erheblicher Elektronendichte dar. Oft kommen sie einzeln vor und liegen excentrisch, ja sogar randständig. Es lassen sich aber auch bis zu 4 Nucleoli in einer Schnittebene nachweisen. Bei stärkerer Vergrößerung erweisen sich ihre Konturen als so irregulär und undeutlich, daß eine genaue Grenze zum übrigen Karyoplasma nicht ausgemacht werden kann. Die verschiedenen Bestandteile des Nucleolus erscheinen in bandförmigen, locker verflochtenen Strängen aggregiert, die umeinandergeschlungen sind. Die Bänder bilden also ein Netzwerk, dessen Maschen als Nucleolusvacuolen bezeichnet werden. Sie sollen im Einzelnen erläutert werden. Bei genauer elektronenmikroskopischer Analyse des Nucleolus lassen sich immer wiederkehrende Strukturen nachweisen:

- a. dicht gepackte Granula, die mit $150 - 200 \text{ \AA}$ Durchmesser Ribosomengröße erreichen. Daneben findet man Körner von $50 - 100 \text{ \AA}$ Durchmesser, die als Vorläufer der Ribosomen gelten können. Diese Granula,

die in Nucleoli anderer Zellen wegen ihrer RNase-empfindlichkeit auch als RNP-Granula bezeichnet wurden, sind in einer Matrix eingebettet, die wahrscheinlich, wie aus Punkt c hervorgeht, aus Protein zu bestehen scheint. Diese granulären Strukturen sind oft dem fibrillär aussehenden Geflecht, wie es unten beschrieben wird, beigelegt bzw. an ihm angeheftet.

- b. Strukturen, die einen fibrillären Charakter aufweisen. So lassen sich bei stärkerer Vergrößerung feine Filamente mit einem Durchmesser von etwa 100 Å erkennen. Diese sind häufig dicht gedrängt als bandartige Areale zusammengelagert. Diese Filamente sind relativ elektronendicht, besonders wenn sie zu mehreren eng zusammengelagert sind. Sie erscheinen deshalb dichter als die übrigen Bestandteile des Nucleolus. Sie sind den chromatinhaltigen Gebieten im Karyoplasma morphologisch ähnlich und könnten nucleolus-assoziiertes Chromatin repräsentieren. Zum Teil reichen diese fibrillären Bezirke bis in die periphere Schicht, die von umgebendem Chromatin gebildet wird.

Daneben kommen aber noch Filamente vor, deren Durchmesser geringer als 100 Å ist. Auch sie können als kleine Bündel vorkommen. Bei Untersuchungen mit RNase stellte sich heraus, daß es sich hier offenbar um die noch filamentären Vorstufen der später granulären ribosomalen Vorstufen handelt (Bernhard, 1966).

- c. Außerdem sieht man im Nucleolus noch einige kleinere Regionen, die sich schwieriger identifizieren lassen. Sie sind weniger dicht als die granulären und

fibrillären Gebiete und enthalten nur wenige klare Strukturen. In diesen kontrastarmen Zonen des Nucleolus befinden sich nur sehr geringe Mengen an Filamenten oder feingranulären Bestandteilen und amorphem Material. So imponieren diese helleren Bezirke zwischen den dichten Bändern als Vakuolen. Ihr Inhalt unterscheidet sich nicht wesentlich von der Masse des umgebenden Karyoplasmas. Wie durch enzymatische Verdauung gezeigt werden konnte (Schoefl, 1964; Bernhard, 1966), besteht das amorphe Material hauptsächlich aus Protein.

II. Nucleolus der Decidua nach Actinomycinbehandlung

Die Wirkung des Actinomycin-D auf die Feinstruktur der Deciduazellen läßt sich elektronenmikroskopisch gut erfassen. Es besteht eine klare Zeitabhängigkeit der Wirkung. Während nach vier Stunden die Veränderungen, die im folgenden genauer beschrieben werden sollen, noch nicht sichtbar sind, treten sie 12 und 24 Stunden nach Applikation der Substanz deutlich hervor. Liegt die Injektion jedoch schon 48 Stunden zurück, ist der größte Teil dieser strukturellen Abweichung von der Norm morphologisch nicht mehr faßbar.

Die ausgeprägtesten Veränderungen nach Actinomycingabe betreffen den Kern und besonders auch den Nucleolus. Es lassen sich zwei Phänomene mit dem Elektronenmikroskop morphologisch deutlich darstellen: erstens eine Verdichtung des Chromatins und zweitens eine Segregation des Nucleolus.

In den Verdichtungszone des Chromatins aggregieren die weiter oben beschriebenen filamentären und granulären Strukturen des Karyoplasmas so dicht, daß Einzelheiten nur in sehr dünnen Schnitten und bei sehr hoher Vergrößerung gesehen werden können. Diese sog. Chromatinverdichtungen bleiben jedoch noch relativ klein und unregelmäßig über den Kernschnitt verstreut. In der Peripherie des Kernes, dicht unter der Kernmembran, sind sie besonders häufig zu finden. Eine Abgrenzung gegenüber den normalen Verhältnissen ist an diesen Stellen besonders schwer, da hier schon unter normalen Bedingungen das dichte Randchromatin lokalisiert ist. Bis zu ausgeprägten Verdichtungszone kommen alle Übergänge vor. Durch das Kleinbleiben der dabei entstehenden Verdichtungsplaques besteht aber niemals die Gefahr einer Verwechslung mit typischen Kern-

pyknosen. In einem pyknotischen Kern findet man große Verdichtungsareale, die häufig einen viertel bis einen halben Kernabschnitt ausfüllen.

Das zweite morphologische Merkmal einer Actinomycinwirkung betrifft den Nucleolus und wurde als Segregation bezeichnet. Die Vorgänge, die sich dabei abspielen, lassen sich nur auf dem Boden des normalen Nucleolusaufbaues erklären. Wie im Anfangsteil der Befunde bereits eingehender beschrieben wurde, können wir zusammenfassend sagen, daß der Nucleolus innig vermischte filamentäre und granuläre DNS- bzw. RNS-Strukturen sowie mehr amorphes Protein enthält. Im folgenden soll jetzt versucht werden, aus der großen Zahl statischer elektronenmikroskopischer Momentbilder eine dynamische Zeitsequenz zu konstruieren, aus der dann möglicherweise auch eine causale Sequenz abgelesen werden kann. Ähnlich wie im übrigen Karyoplasma verdichten sich nach Applikation von Actinomycin-D auch hier die Areale, die DNS enthalten, indem die Packungsdichte ihrer Strukturen zunimmt. Dadurch geht das bei niedriger Vergrößerung relativ homogene Aussehen des Nucleolus verloren. Gleichzeitig wird aber ein Trend der DNS-Strukturen deutlich, sich aus dem Nucleolusbereich zurückzuziehen. Schließlich haben alle DNS-Strukturen den Rand erreicht und sind in der Peripherie des Nucleolus ringförmig lokalisiert. Die verbleibenden Strukturen im zentralen Bereich rücken jetzt ebenfalls näher zusammen. Die helleren Bereiche gehen dabei verloren, und das Nucleoluszentrum bekommt bei Übersichts- und mittlerer Vergrößerung ein homogen gleichmäßiges Aussehen von mittlerer Elektronendichte. Der DNS-Ring in der Peripherie erscheint bei der angewandten Preparationstechnik dunkler. Das beruht einmal auf der bereits beschriebenen Packungsdichte der Strukturen, dann aber auch auf der Verwendung von Uramylacetat zur Kontrastierung. Diese Substanz lagert sich bevorzugt an

die DNS an und hebt sie dadurch im elektronenmikroskopischen Bild hervor.

Im weiteren Verlauf der morphologisch faßbaren Actinomycinwirkung reißt die bisher weitgehend kontinuierliche DNS-Hülle um den Nucleolus auf, und es entstehen Fragmente dieser Hülle. Bei stärkster Ausprägung des Effektes lösen sich diese Fragmente zunehmend vom Restnucleolus. Schließlich bleibt der "nackte" Nucleolus, der inzwischen weiter verdichtet ist und nach unserer Vorstellung Reste von RNS und Proteine enthält, übrig. Diese Vorgänge sind sicher reversibel. Die Wiederherstellung der normalen Nucleolusmorphologie geht dabei den umgekehrten Weg. Einzelne, dichte Chromatin-plaques nähern sich wieder dem Nucleolusrest, lagern sich ihm an und verschmelzen zu einem kontinuierlichen Ring. Schließlich vermischen sich beide Anteile wieder und stellen so den typischen und ursprünglichen Zustand wieder her. Diese Wiederherstellung geht zwischen 24 und 48 Stunden vor sich. Nach 48 Stunden enthalten die meisten Kerne bereits wieder normale Nucleoli. Gleichzeitig haben sich die kleinen Verdichtungsplaques im übrigen Karyoplasma entsprechend dem normalen Bild wieder aufgelockert.

Cytoplasmatische Veränderungen sind vergleichsweise in entsprechender Deutlichkeit in den Deciduazellen nicht nachzuweisen. 24 Stunden nach der Applikation des Actinomycin-D läßt sich eine Beeinflussung des rauhen ER nachweisen. Dieses Zellorganell kommt, wie von Möller (1972) eingehend beschrieben, in den reifen Deciduazellen in so großer Menge vor, daß ein leberzellähnliches Bild entsteht. Das normalerweise aus flachen, mehr oder weniger langgestreckten und angedeutet parallel gepackten Membranstapeln bestehende Hohlraumsystem zeigt 24 Stunden nach Actinomycingabe folgende Abweichung vom

normalen Bild:

In einigen Zellen sind die endoplasmatischen Hohlräume fragmentiert und die entstehenden Bruchstücke leicht gebläht, so daß es zu einer Abrundung kommt. An den Membranen dieser Abschnitte ist auch der Ribosomenbesatz weniger dicht, so daß hier eine Ablösung der Ribosomen angenommen werden kann. Auch diese Veränderungen sind 48 Stunden nach Applikation von Actinomycin nicht mehr nachzuweisen.

Alle übrigen, morphologisch beurteilbaren Parameter, die Struktur der Zellorganellen, Zellmembranen, Kapillaren und die Zellkontakte lassen keinen Actinomycineffekt erkennen und brauchen deshalb hier nicht beschrieben werden.

Einen eigenartigen Effekt konnten wir dagegen im Bereich der Interzellularräume nach Applikation von Actinomycin-D erheben: während der normalen Deciduaentwicklung geht hier ein Abbau des ursprünglich vorhandenen Bindegewebsgerüsts vor sich. Dabei kommt es zu einem Abbau der vorhandenen kollagenen Fibrillen und Proteoglycane und zu einer zunehmenden Engerstellung des Interzellularraumes, der schließlich unter Bildung enger Zellkontakte auf großen Strecken völlig verschwindet. Nach Applikation von Actinomycin sind diese Vorgänge gestört. Während im Normaltier am Tag 10 schon alle interzellulären Strukturen verschwunden sind, finden sich beim actinomycinbehandelten Tier zu diesem Zeitpunkt noch einzelne kollagene Fibrillen und filamentäres Material sowie ein Klaffen der Interzellulären Räume. Eine Störung des Abbaus der Interzellulärsubstanz unter der Einwirkung des Actinomycin-D kann deshalb vermutet werden.

Diskussion

Bei der Betrachtung der elektronenmikroskopischen Bilder von der Rattendecidua auf dem Höhepunkt ihrer Entwicklung fallen eine Reihe cytologischer Merkmale auf: Große, aufgelockerte Kerne mit riesigen Nucleoli, ein großes Cytoplasmavolumen gefüllt mit zahlreichen Zellorganellen, besonders mit rauhem E R und Mitochondrien sowie epithelähnliche Zellkontakte. Dieses Bild entspricht morphologisch einem außerordentlich stoffwechselaktiven Zellverband, wie er z.B. auch in Leber nachweisbar ist. Es erhebt sich deshalb die Frage nach der Funktion und dem Sinn dieser Stoffwechselleistung. Villegas und Merker (1970), Merker und Villegas (1970) sowie Möller (1972) haben diese Frage etwa folgendermaßen beantwortet: Bis zum Zeitpunkt des Beginns der Plazentafunktion wird der Keim ernährt durch eine sog. "Histiotrophe Flüssigkeit". Diese aus der flüssigen Phase des Blutes und einer Gewebslymphe bestehende Nährlösung muß das deciduale Gewebe durchfließen, ehe es den Keim erreicht. Dieser Weg führt durch die sehr engen Interzellularspalten des decidualen Gewebes, d.h. es wird von diesen Zellen kontrolliert (Merker und Villegas, 1970). Auf diese Weise könnte die Deciduazelle durch eine eigene Stoffwechselleistung zur Zusammensetzung der Nährflüssigkeit beitragen. Auf der Basis der elektronenmikroskopischen Befunde muß angenommen werden, daß in diesen Zellen hauptsächlich Proteine synthetisiert und sezerniert werden (Birbeck und Mercer, 1961; Merker, 1964). Auch gemäß den Angaben von Shelesnyak und Tic (1963) beginnt im Uterus der Gehalt von RNS und darauffolgend der Proteingehalt kurze Zeit nach der decidualen Induktion um jeweils 95 % pro Tag stark anzusteigen. Beteiligt sich nun die Deciduazelle an der Ernährung des Embryos,

so muß deshalb zunächst an eine Bildung von Proteinen gedacht werden. Die mächtige Entwicklung der Decidua und der hohe Differenzierungsgrad ihrer Zellen ließen diese Ernährungsfunktion besonders zu den frühen Phasen, vor dem Funktionsbeginn der Placenta, als sehr wichtig erscheinen.

Wenn diese Vorstellung stimmt, müßte unterstellt werden, daß Störungen dieser Funktion zu Störungen der normalen Entwicklung des Keimes führen. Als Störungsmöglichkeiten kommen u.a. Medikamente in Frage, die die Proteinsynthese hemmen, wie das hier verwendete Actinomycin-D. Die teratogene Wirkung von Actinomycin-D ist schon seit langer Zeit bekannt (Unger und Dickson, 1971; Zimmermann und Gottschewski, 1965; Wilson, 1966; Tuchmann-Duplessis, 1969; Taska und Hillman, 1970; Shalko und Merse, 1969; Carpent et al., 1967; Desveaux-Chabrol, 1965). Nach Gaben im Zeitraum zwischen Tag 8 und 11 lassen sich eine Fülle der klassischen Mißbildungen beobachten. Interessant und auffällig ist der plötzliche Abfall der Teratogenität des Actinomycins während des Tages 11 bzw. 12. Nach diesem Zeitpunkt lassen sich keine Mißbildungen mehr erzeugen. Dieses eigenartige Verhalten könnte unter Berücksichtigung unserer Vorstellungen auf folgende Weise erklärt werden: Es muß daran gedacht werden, daß die Plazenta, die sich zwischen Tag 11 und 12 entwickelt, eine Barriere für den Transport des Actinomycins von der Mutter zum Keim darstellt. Für diese Vorstellung sprechen zahlreiche Befunde. So konnten Köhler und Merker (1972) nach Injektion von ^3H -markiertem Actinomycin in das Muttertier und anschließender Messung der Verteilung nachweisen, daß nach dem Tag 12 keine meßbaren Mengen dieser Substanz auf den Embryo übergehen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Wilson (1966) und Jordan und Wilson (1970) mittels autoradiographischer Untersuchungen. Sie konnten nachweisen,

daß die Menge der Silbergranula ab Tag 11 kontinuierlich abnimmt. Eine Plazentabarriere für Actinomycin-D ist also ohne Zweifel nach Tag 12 zu postulieren. Bis zum Tag 10 ist dagegen ein freier Zustrom selbst großmolekularer Substanzen wie Antikörper und Ferritin von der Mutter zum Keim möglich (Brent, 1970; Buettner, 1972; Barnes, 1959; Brambell und Halliday, 1956; Hemmings, 1958; Leissring und Anderson, 1961; Padykula et al., 1966). Zwischen Tag 10 und 12 verändern sich die Permiabilitätsbedingungen zwar durch den Schluß des Dottersackepithels erneut (Lit. siehe Buettner, 1972), jedoch ist ein gewisses Minimum an Substanztransport durch den ausgeprägten Vesikelfluß (Endocytose) am apikalen Bereich zu vermuten. Wie aus der Arbeit von Köhler und Merker (1972) zu entnehmen ist, läßt sich aber eine morphologisch faßbare Schädigung des Embryos auch vor dem Tag 10 während der Wirkung des Actinomycins nicht nachweisen. Erst relativ spät, etwa 48 Std. nach Applikation von Actinomycin-D, kommt es zur Resorption und damit zu ausgedehnten Nekrosen. Der Nachweis einer Schädigung an der Decidua ohne gleichzeitige, deutliche Schädigung des Embryos, obwohl Actinomycin im Untersuchungszeitraum frei embryonales Gewebe erreicht, muß deshalb auf andere Weise erklärt werden.

Verschiedene Autoren haben berichtet, daß Actinomycin nicht auf alle Zelltypen gleichmäßig wirkt (Le Moigne et Gabriel, 1970). Das hängt einmal mit der biologischen Halbwertszeit bzw. mit der Höhe und Schnelligkeit der Umsatzrate der RNS zusammen. Zelltypen mit langlebiger RNS (Linsenepithelien und Vorstufen der roten Reihe) werden deshalb durch einen RNS-Synthesehemmer wenig geschädigt. Andere Zelltypen zeigen dagegen innerhalb von Stunden Nekroseerscheinungen. Hier konnte die Hemmung einer wichtigen, schnellgebildeten

RNS postuliert werden. Wenn Actinomycin das embryonale Gewebe erreicht, ohne eine direkte Wirkung auszuüben, so könnte vermutet werden, daß die embryonalen Zellen relativ unempfindlich gegen diese Substanz sind. Unterstützend in dieser Hinsicht erweisen sich die Befunde von Le Moigne und Gabriel (1970 II und 1971) an Planarians, nämlich, daß Actinomycin zwar in alle Zellen und Zellkerne, unabhängig vom Grad ihrer morphologischen Differenzierung, eindringen kann, aber bei jungen, sich regenerierenden Tieren mit undifferenzierten Zellen kein hemmender Effekt auf das Anwachsen der Proteinsynthese und Regeneration festzustellen ist - im Gegensatz zu erwachsenen Tieren.

Der Keim ist aber trotzdem nach Actinomycin-D-Behandlung in dem von uns betrachteten Zeitraum geschädigt, wie die hohe Resorptions- und Mißbildungsrate beweisen. Es muß deshalb die Frage gestellt werden, über welchen Mechanismus es dann überhaupt zu einer Schädigung des Keimes kommt.

Zur Beantwortung dieser Frage bieten sich die Veränderungen der Decidua an: Messungen der Gewichtszunahme der Decidua und des Uterus durch Sananes und Psychoyos (1970) ergaben, daß die i.v.-Injektion von Actinomycin zu einer vollkommenen bzw. 50 % igen Hemmung der Entwicklung der Decidua führt, wenn die Injektion 24 - 48 Stunden nach der Setzung eines decidualen Reizes erfolgt, wobei der Grad dieser Wirkung von der Dosis und vom Zeitpunkt der Gabe des Antibiotikums abhängt (Sananas und Psychoyos, 1970; Di Paolo und Elis, 1970). Auch in unseren Untersuchungen, bei denen wir die Decidua von der morphologischen Seite betrachteten, lassen sich Veränderungen deutlich erfassen. Am hervorstechendsten sind die strukturellen Abweichungen im Bereich des Nucleolus. Rein morphologisch sieht man eine Trennung der verschie-

denen Bestandteile vom Nucleolus und eine Verdichtung und Schrumpfung der Reststrukturen. Dieses Verhalten des Nucleolus unter Actinomycin ist bereits in Geweben erwachsener Tiere mehrfach nachgewiesen und als Segregation bezeichnet worden (Lit. siehe Einleitung). Dieses Bild soll der morphologische Ausdruck einer Hemmung der ribosomalen RNS-Synthese sein. Auch hier in den Kernen der Rattendecidua kann deshalb von einer Segregation gesprochen werden. Zur normalen Funktion eines Nucleolus ist sicher die innige Vermischung zwischen DNS und RNS sowie Protein Voraussetzung. An den DNS-Ketten werden die fädigen Vorstufen der Ribosomen aufgebaut, die dann anschließend je zu zwei ungleich großen Bruchstücken zerfallen und sich zu granulären Gebilden umformen (Lit. siehe Merker, 1972). Wenn sich nun die DNS aus dem Nucleolus zurückzieht, liegt die Annahme nahe, daß der Restnucleolus aus geringen Resten von RNS und den übrigen Bestandteilen des Nucleolus, besonders Protein, besteht. Möglicherweise ist aber die Interferenz mit der RNS-Synthese nicht allein verantwortlich für die beschriebenen nucleolären Veränderungen (Goldblatt et al., 1969). Es könnten hier auch Proteine fehlen, die zur Strukturhaltung notwendig sind. Genauere Einzelheiten sind aber leider noch nicht formuliert. Die Veränderungen des Nucleolus nach Gaben von Actinomycin sind sicher reversibel. Das bestätigen die Untersuchungen von Lorch et Jeonker (1969), Le Moigne et Gabriel (1970 I und II) und Goessens et Bassleer (1970), die eine Regeneration noch nach einer 48 stündigen Actinomycinbehandlung nachgewiesen haben. Unabhängig vom Hinweis auf einen Mechanismus, der damit verknüpft sein könnte, aber morphologisch nicht zu prüfen ist, weist die Reversibilität auf eine Dynamik der Chromosomen hin. Die Chromosomen sind ohne Zweifel in der Zelle nicht fest verankert,

sondern sind in der Lage, Bewegungen durchzuführen. Diese Fähigkeit führt zum Zurückziehen des sog. Nucleolus-organizer-chromosoms und nach Wegfall dieser Wirkung zu einer erneuten Zusammenführung im späteren Nucleolusbereich. Die übrigen Veränderungen im Cytoplasma - Fragmentation, Vesikulation und Degranulation des rauen E R - müssen als Antwort auf das Ausbleiben der ribosomalen RNS, d.h. der Ribosomen und der folgenden Proteinsynthesestörung gesehen werden. Über den eigentlichen Wirkungsmechanismus dieses Vorgangs, der sich bei vielen Zellschädigungen abspielt, ist noch nichts Sicheres bekannt. Ein Nachweis der Hemmung der Proteinsynthese ergibt sich aus dem bisher bekannten Zusammenhang zwischen RNS- und Proteinsynthese, aus autoradiographischen Untersuchungen an den verschiedensten Tierarten, die sich vor allem mit der Leucineinlagerung in Protein befaßten, aus der Zunahme der Einzelribosomen und Abnahme der Polysomen, die der Reduktion der Proteinsynthese parallel gehen, sowie aus der Abnahme der Zahl der Zymogengranula (Rodriguez, 1967). Inwiefern durch die Hemmung der Proteinsynthese ein rückläufiger Einfluß auf den Nucleolus und damit auf die Entstehung der dortigen Veränderungen besteht, ist von Goldblatt et al., (1970) teilweise, aber nicht völlig ausgeschlossen worden.

Aufgrund der elektronenmikroskopischen Bilder kann der Versuch gemacht werden, die bisher mit Actinomycin-D erhobenen Befunde zu erklären.

Dabei ist zu berücksichtigen

1. daß bei Ratten nach dem Tag 12 mit Actinomycin praktisch keine Mißbildungen mehr zu erzeugen sind (Lit. siehe Tuchmann-Duplessis, 1959 a, b; 1960 a, b; 1964)

2. der geringe morphologische Effekt bis 48 Stunden nach Applikation des Actinomycins (Köhler und Merker, 1972),
3. die in unserem Material deutlich darstellbaren Schädigungen der Decidua und schließlich
4. der von verschiedenen anderen Autoren nachgewiesene Effekt auf die Deciduaentwicklung (Sananes und Psychoyos, 1970).

Wir haben versucht diese Effekte in einer Hypothese zu vereinigen. Das gelingt jedoch nur, wenn man zwei Voraussetzungen anerkennt:

1. Actinomycin wirkt, wie Le Moigne et Gabriel (1970/71) bereits vermuteten, nicht auf alle Zelltypen gleichmäßig; wachsende und proliferierende Gewebe sollen unempfindlicher sein.
2. Die Decidua hat neben den verschiedenen, bisher bekannten Funktionen (De Feo, 1967; Merker und Villegas, 1970; Müller, 1972) noch weitere für den Embryo lebenswichtige Aufgaben, z.B. die Anreicherung der Histiotrophe mit speziellen Proteinen. Für eine hohe Eiweißsyntheserate spricht das elektronenmikroskopische Bild mit dem stark ausgeprägten rauhen E R, Golgiapparat und Segretgranula. Nicht zuletzt weist die bereits erwähnte mächtige Entwicklung der Decidua bei den Rodentia auf die Wichtigkeit dieses Gewebes hin.

Akzeptiert man diese beiden Voraussetzungen, so kann man die oben summierten Befunde etwa folgendermaßen erklären:

Bis zum Tag 10, d.h. bis zum Schluß des Dottersackepithels und noch einen Tag weiter erreicht zwar das Actinomycin embryonales Gewebe, ist hier aber weniger wirksam. Ge-

schädigt wird dagegen die Decidua, die darüberhinaus in dieser Zeit ihre ausgeprägteste, funktionelle Bedeutung hat. Nach dem Tag 11/12, d.h. nach Beginn der Plazentafunktion und durch die Existenz einer Plazentabarriere für Actinomycin erreicht diese Substanz nicht mehr den Embryo. Da darüber hinaus nach Tag 12 die Decidua durch den Funktionsbeginn der Plazenta keine wichtige Rolle mehr spielt, führt die immer noch eintretende Schädigung der Decidua nicht mehr zu einem faßbaren Defekt.

Zweifellos ist diese Hypothese noch an vielen Stellen experimentell zu untermauern. Wir glaubten uns aber berechtigt, sie unter ausdrücklicher Betonung ihrer Vorläufigkeit zu diskutieren, um auf einen Mechanismus der Mißbildungsentstehung hinzuweisen, der bisher zweifellos bei allen Deutungen der teratogenen Effekte vernachlässigt wurde: Der Angriffspunkt der Decidua. Dieser Effekt, der sekundär zur Keimschädigung führen kann, sollte neben der direkten Wirkung auf embryonales Gewebe und genetischen Abweichungen berücksichtigt werden.

Bisher wurde die Bedeutung der decidualen Proteinsynthese für die Ernährung des Keimes diskutiert. Das elektronenmikroskopische Bild der normalen und Actinomycin-behandelten Decidua weist aber noch auf eine andere Funktion der hier gebildeten Eiweiße hin (Möller, 1972; Villegas und Merker, 1970): Die enzymatische Auflösung der Strukturen im Interzellularraum der Decidua, also Kollagen und Proteoglykane. Ein Teil der gebildeten Proteine stellt also vielleicht Kollagenasen oder ähnliche Enzyme dar. Eine Hemmung der Proteinsynthese, z.B. durch Actinomycin würde also auch diese Funktion der Decidua stören. Tatsächlich ist der elektronenmikroskopisch

nachweisbare Abbau der interzellularen Strukturen nach Applikation von Actinomycin verlangsamt, so daß die vermutete Beteiligung der Decidua am Abbau des ortsständigen Bindegewebes postuliert werden kann.

Zusammenfassung

Die Feinstruktur der Decidua von Ratten am Tag 8 bis 12 der Schwangerschaft wurde nach Applikation von Actinomycin-D untersucht.

Die Wirkung von Actinomycin-D auf die Feinstruktur der Deciduazellen ist nur zwischen 12-ter und 24-ter Stunde nach Applikation, aber nicht vor- oder nachher festzustellen.

Sie zeigt sich

1. als Verdichtung des Chromatins in Form kleiner Plaques.
2. als Segregation der Nucleoli, d.h. eine Verdichtung der DNS enthaltenden Areale, Zurückziehen der DNS aus dem Nucleolusbereich bis zur ringförmigen Umlagerung des Nucleolus und schließlicher Fragmentation der DNS-Hülle. Die zentralen Anteile des Nucleolus rücken dabei zusammen, die helleren Bereiche gehen verloren.

Diese Vorgänge sind reversibel. Nach 24 - 48 Stunden kommt es auf dem umgekehrten Weg zur Wiederherstellung des alten Zustandes.

Cytoplasmatische Veränderungen sind nicht entsprechend deutlich. Das raue E R, das in den reifen Deciduazellen in so großer Menge vorkommt, zeigt 24 Stunden nach Actinomycineinwirkung Fragmentation, Vesikulation und Degranulation. Diese Vorgänge sind ebenfalls reversibel. Der für Deciduazellen normale Abbau des Bindegewebsgerüsts in den Interzellularräumen und deren Engerstellung bzw. Verlust ist gestört.

Aufgrund des elektronenmikroskopischen Befundes werden folgende Schlüsse gezogen: In den Decidua-
zellen wird Protein gebildet. Dieses Protein dient
zum Teil der Anreicherung der Histiotrophe und da-
mit der Ernährung des Keimes. Eine Schädigung der
Decidua, z.B. durch Actinomycin kann deshalb über
eine Minderung der Proteinbereitstellung zu einer
Keimschädigung führen. Diese Arbeit soll zur
Festigung der These beitragen, daß bei einer Keim-
schädigung der Angriffspunkt an der Decidua als
teratogenes Prinzip zu berücksichtigen ist.

Literatur

- AMOROSO, E.G.: Placentation - In: Marshall's physiology of production. (ed. by A.S. Parkes) Kap. 15, 267 (1952) Longmans, London
- ANTLEY, R.M. und Fox, A.S.: The relationship between RNA- und proteinsynthesis and the aggregation of drosophila embryonic cells. - Develop.Biol. 22, 2 282-297 (1970)
- BARNES, J.M.: Antitoxin transfer from mother to foetus in the guinea pig. - J.Path.Bact. 77, 371-380 (1959)
- BERNHARD, W.: Ultrastructural aspects of the normal and pathological nucleolus in mammalian cells. - In: International symposium: The nucleolus, its structure and function. Natl.Cancer Inst. Monograph. 23, 13-38 (1966)
- BIERLING, R.: Die Wirkung von Actinomycin auf menschliches Gewebe in vitro. - Z. Krebsforsch. 63, 519-522 (1960)
- BIRBECK, M.C. und Mercer, E.H.: Cytology of cells which synthesize protein. - Nature, (Lond.) 189, 558 (1961)
- BRAMBELL, F.W.R. und HALLIDAY, R.: The route by which passive immunity is transmitted from mother to foetus in the rat. - Proc.Soc., Series B 145, 170-178 (1956)

- BRENT, R.L.: Antibodies and malformations - In: Advances of biosynthesis 6, Oxford: Pergamon, Braunschweig: Vieweg (1970) im Druck
- BUETTNER, G.: Die Feinstruktur des Dottersack-epithels von Rattenembryonen. - Zur Vorbereitung als Dissertation an der FU Berlin (1972)
- CARPENT, G. und DESCLIN, L.M.: A propos du mécanisme d'action de l'actinomycin-D sur la gestation chez le rat. - R.C.Acad.Sci.(Paris) 264, 2933-2936 (1967)
- DAVID, H.: Zum Verhalten von granulärem Endoplasmatischem Retikulum, Polysomen und Ribosomen in der Leber nach Actinomycin-Gabe. - Verhandlungen d. anat. Gesellsch. (63.Vollvers. 1968) VEB Gustav-Fischer Verlag Jena 223-227 (1969)
- DE FEO, V.J.: Decidualization - In: Cellular Biol. of the uterus (ed by R.M. Wynn) North-Holland Publishing Company: Amsterdam 191-290 (1967)
- DE MAN, J.C.H. und NOODUYN, N.J.A.: Light and electron-microscopic radioautography of hepatic cell nucleoli in mice treated with actinomycin-D. - J.Cell.Biol. 33, 489 (1967)
- DESVEAUX-CHABROL, J.: Rôle de l-actinomycine dans les recherches récentes en embryologie. - Anné Biol. 4, 495-545 (1965)
- DE VINCENTIS, M. und LANCIERI, M.: Observations on the sea urchin embryos in the presence of actinomycin. - Exp.Cell.Res. 59, 3 479-481 (1970)

DI PAOLO, J.A. und ELIS, J.: Effect of actinomycin-D and urethan on successive litters and generations of mice. - *Teratology* 3, 1 53-58 (1970)

FICQ, A.: Effets de l'actinomycine-D et de la puromycine sur le métabolisme de l'oocyte en croissance. Etude autoradiographique. *Exp.Cell. Res.* 34, 581-594 (1964)

FINN, C. und Mc LAREN, A.: A study of early stages of implantation in mice. - *J.Reprod.Fertil.* 13, 259-267 (1967)

FLICKINGER, CH.J.: The fine structure of the nucleoli of normal and actinomycin-D treated amoeba proteus. - *Ultrastruct. Res.* 23, 260-271 (1968)

FRANKLIN, R.M.: The inhibition of ribonucleic acid synthesis in mammalian cells by actinomycin-D. - *Biochim.Biophys.Acta* 72, 555-565 (1963)

GIRARD, M., PENMAN, S. und DARNELL, J.E.: The effect of actinomycin on ribosome formation in He La cells. - *Proc.Nat.Acad.Sci.(USA)* 51, 205-211 (1964)

GOESSENS, G. und BASSLEER, R.: Etude cytologique et cytochimique de la reversibilité des effets de l'actinomycine-D dans des fibroblastes cultivés in vitro. - *Inst.Histol.,Univ.Liege* - *Arch.Biol.(Liege)* 81, 2 165-192 (1970)

- GOLDBERG, J.H., RABINOWITZ, M. und REICH, E.: Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA- polymerase synthetic reactions by actinomycin. - Proc.Nat.Acad. Sci.(Wash.) 48, 2094 (1962)
- GOLDBERG, J.H. und RABINOWITZ, M.: Actinomycin-D inhibition of deoxyribonucleic acid-dependent synthesis of ribonucleic acid. - Science 136, 315-316 (1962)
- GOLDBERG, J.H. und REICH, E.: Actinomycin inhibition of RNA synthesis directed by DNA. - Fed.Proc. 23, 958 (1964)
- GOLDBLATT, P.J., SULLIVAN, R.J. und FARBER, E.: Induction of partial nucleolar segregation in hepatic parenchymal cells by actinomycin-D following inhibition of ribonucleic acid synthesis by ethionine. - Investigation Vol. 20, 3 283 (1969)
- GOLDBLATT, P.J., VERBIN, R.S. und SULLIVAN, R.J.: Induction of nucleolar segregation by actinomycin-D following inhibition of protein synthesis with cycloheximide. - Exp.Cell.Res. 63, 117-123 (1970)
- HAN, S.S.: An electron microscopic and radioautographic study of the rat parotid gland after actinomycin administration. - Am.J.Anat. 120, 161 (1967)
- HARBERS, E. und MÜLLER, W.: On the inhibition of RNA-synthesis by actinomycin. - Biochem.and Biophys.Res.Comm. 7, 2 107-110 (1962)

- HARTMANN, G. und COY, U.: Zum biologischen Wirkungsmechanismus der Actinomycine. - Angew.Chem. 74, 501 (1962)
- HEINE, U., LANGLOIS, A.J. und BEARD, J.W.: Ultrastructural alterations in avian leukemic myeloblasts exposed to actinomycin-D in vitro.- Cancer Res. 26, 1847 (1966)
- HEMMINGS, W.A.: Protein selection in the yolk-sac splanchnopleus of the rabbit: The total uptake estimated as loss from the uterus. - Proc.Roy.Soc., Series B. 148, 76-83 (1958)
- HURWITZ, J., FURTH, J.J., MELANY, M. und ALEXANDER, M.: The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis: III. The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid by actinomycin-D and proflavin. - Proc. Nat.Acad.Sci.(Wash.) 48, 1222 (1962)
- JACOB, J. und SIRLIN, J.L.: Electron microscopic studies on salivary gland cells. IV. The nucleus of smittia parthenogenetica (Chironomidae) with special reference to the nucleolus and the effects of actinomycin thereon. - J.of Ultrstruct.Res. 11, 315-328 (1964)
- JÉZÉQUEL, A.M. und BERNHARD, W.: Modifications ultrastructurales du pancréas exocrine de rat sous l'effet de l'actinomycine-D. - J.of Microscopie 3, 279-296 (1964)
- IGARASHI, E. und YURA, T.: The role of RNA-polymerase in genetic transcription. - Biochem. and Biophys.Res.Communic.Vol. 34, 1 (1969)

- JOLIE, W.P.: Fine structural changes in the junctional zone of rat placenta with increasing gestational age. - J.Ultrastruct.Res. 12, 420-438 (1965)
- JORDAN, R.L. und WILSON, J.G.: Radioautographic study of RNA synthesis in normal and actinomycin-D treated rat embryos. - Anat.Record. 168, 549-564 (1970)
- JOURNEY, L.J. und GOLDSTEIN, M.N.: Electron microscope studies on HeLa cell lines sensitive and resistant to actinomycin-D. - Cancer Res. 21, 929-932 (1961)
- KERSTEN, W., KERSTEN, H. und RAUEN, H.M.: Action of nucleic acids on the inhibition of growth by actinomycin of neurospora crassa. - Nature 187, 60 (1960)
- KERSTEN, W.: Interaction of actinomycin-D with constituents of nucleic acids. - Biochim.Biophys.Acta 47, 610 (1961)
- KIRBY, D.R.S.: The role of the uterus in the early stages of mouse development. - In: Preimplantation stages of pregnancy.Ciba found.Sympos, &ed by G.Wolstenholme and M.O'Connor) 325-331 (1965)
- KIRBY, D.R.S.: The extra-uterine mouse egg as an experimental model. - In: Advances in the biosciences Schering sympos.mechanisms involved in conception.Pergamon Press and Vieweg Verlag 4, 255-273 (1969)

KIRK, J.M.: The mode of action of actinomycin-D.-
Biochem.Biophys.Acta 42, 167 (1960)

KÖHLER, E. und MERKER, H.J.: Studies on the teratogenic phase specificity of actinomycin-D in the rat. - Naunyn-Schmiedebergs Arch. (1972)
im Druck

LEISSRING, J.C. und ANDERSON, J.W.: The transfer of serum proteins from mother to young in the guinea pig. I. Prenatal rates and routes. - Am.J.Anat. 109, 149-155 (1961)

LE MOIGNE, A. und GABRIEL, A.: On the action of actinomycin-D on the cellular differentiation during the regeneration in planarians.

I. Morphological, histological and ultrastructural studies on the regeneration capacity in presence of the antibiotica. - Zeitsch. für Zellforsch. u. mikroskop.Anat. 115, 426 (1970)

-- II. Autoradiographic histological and ultrastructural studies on the action of the antibiotic on RNA-synthesis. - Z. für Zellforsch. u. mikroskop.Anat. 115, 442 (1970)

-- III. Ultrastructural study of tritiated actinomycin penetration into regenerating cells. - Z. für Zellforsch. u. mikroskop. Anat. 122, 1 26 (1971)

LORCH, J.J. und JEONKER: Reversible effect of actinomycin on nucleoli of amoeba discoides: Nuclear transplantations study. - Nature (Lond.) 221, 1073-1074 (1969)

- MERKER, H.J.: Die Veränderungen der Rattenvagina im Zyklus und unter experimentellen Bedingungen. - Habil.-Schrift, FU Berlin (1964)
- MERKER, H.J. und VILLEGAS: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem des Stoffaustausches zwischen Mutter und Keim; Bei Rattenembryonen des Tages 7-10. - Z. für Anat. Entwickl.Gesch. 131, 325-346 (1970) (Springer V.)
- MÖLLER, W.: Die Feinstruktur der Decidua der Ratte. - Dissertation an dem Zahnmedizinischen Fachbereich der FU Berlin, (1972)
- MONESI, V., MOLINARO, M., SPALLETTA, E. und DAVOLI, C.: Effect of metabolic inhibitors on macromolecular synthesis and early development in the mouse embryo. - Exp.Cell.Res. 59, 2 197-206 (1970)
- MÜLLER, H.G.: Der Zelleiweißstoffwechsel während der Nidation, Plazentation und Keimentwicklung. Autoradiographische Untersuchungen mit Isotopen markierten Aminosäuren an trächtigen Ratten. - Urban & Schwarzenberg, München-Berlin (1964)
- MÜLLER, W. und CROTHERS, D.M.: Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA. - J-Mol.Biol. 35, 251-290 (1968)
- NACHTWEY, D.S. und DICKSON, W.J.: Actinomycin-D blockage of cell division of synchronized tetrahymena pyriformis. - Exp.Cell.Res. 47, 581-595 (1967)

- ORSINI, M.W., WYNN, R.M., HARRIS, J.A. und BUTMASH, J.M.:
Comparative ultrastructure of the decidua
in pregnancy and pseudopregnancy. - Am.J.
of Obstetrics and Gynecol. 106, 14-31
(1970)
- PADYKULA, H.A., DEREN, J.J. und WILSON, T.H.: Develop-
ment of structure and function in the mam-
malian yolk sac. I. Developmental morphology
and vitamin B₁₂ uptake of the rat yolk sac.
- Develop. Biol. 13, 311-348 (1966)
- PERRY, R.P.: Selective effects of actinomycin-D on the
intracellular distribution of RNA synthesis
in tissue culture cells. - Exp.Cell.Res. 29,
400-406 (1963)
- REICH, E., FRANKLIN, R.M., SHATKIN, A.J. und TATUM, E.L.:
Effect of actinomycin-D on cellular nucleic
acid syntheses and virus production. -
Science 134, 556 (1961)
- REICH, E., FRANKLIN, R.M., SHATKIN, A.J. und TATUM, E.L.:
Action of actinomycin on animal cells and
viruses. - Proc.Natl.Acad.Sci.(US) 48, 1238
(1962)
- REICH, E.: Biochemistry of actinomycins. - Cancer Res.
23, 1428 (1963)
- REICH, E. und GOLDBERG, J.H.: Actinomycin and nucleic
acid function. - In: Progress in nucleic acid
research and molecular biology (ed by Davidson,
J.H. and Cohn, W.F.) Vol. 3, 183 New York
Academic Press Inc. (1964)

- REID, J.M., SAVAMA, D.S.R. und HERSCHEL SICHTRANSKY:
Actinomycin-D and hepatic polyribosomal dis-
aggregation evidence for different half-
lives of m-RNS of free and membran-bound
polysomes. - Laboratory Investigation 25, 2
141 (1971)
- REYNOLDS, R.C., MONTGOMERY, P.O. und HUGHES, B.:
Nucleolar "caps" produced by actinomycin-D.
- Cancer Res. 24, 1269-1278 (1964)
- RODRIGUEZ, T.G.: Ultrastructural changes in the mouse
exocrine pankreas; induced by prolonged
treatment with actinomycin-D. - J. of Ultra-
struct.Res. 19, 116-129 (1967)
- RÖTZ, R. und KÖHLER, E.: Teratology als Abstract im
Druck. - (1972)
- SANANES, N. und PSYCHOYOS, A.: Effet de l'actinomy-
cine-D sur le développement du déciduome
chez la ratte. - C.R.Acad.Sci.(Paris) 271, 4
430-433 (1970)
- SATOW, Y., OKAMOTO, N., FUKAZAWA, K., IKEDA, T., SHIMADA, K.
und IMABASHI, T.: Electron microscopic observ-
ation on the embryos of the 8 the days of
gestation in the rats. - Hiroshima J.med.
Sci. 15, 407-418 (1966)
- SCHOEFL, G.J.: The effect of actinomycin-D on the fine
structure of the nucleolus. - J. Ultrastruct.
Res. 10, 224-243 (1964)

- SHALKO, R.G. und MERSE, J.M.D.: The differential response of the early mouse embryo to actinomycin-D treatment in vitro. - Teratology 2, 47-54 (1969)
- SHELESNYAK, M.C. und TIC, L.: Studies on the mechanism of decidualisation. IV. Synthetic processes in the decidualizing uterus. - Acta endocrin. 42, 465-472 (1963)
- SIMARD, R. und BERNHARD, W.: Le phénomène de la ségrégation nucléolaire: Spécificité d'action de certains antimetabolics. - Int.J.Cancer 1, 5 (1966)
- SPORS, S.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der lysosomalen sauren Phosphatase in den Keimblättern des Rattenembryo von Tag 8-10. - Histochemie 25, 143-151 (1971)
- STARCK, D.: Embryologie - G.Thieme Verlag Stuttgart (1965)
- STENRAM, U.: Electron-microscopic study on liver cells of rats treated with actinomycin-D. - Z.Zellforschung.Microscop.Anat. 65, 211 (1965)
- STEVENS, B.J.: The effect of actinomycin-D on nucleolar and nuclear fine structure in the salivary gland cell of chironomus thummi. - J.Ultrastruct .Res. 11, 329-353 (1964)
- STEVENS, A.Z.: the controll of nuclear activiti. - In: Goldstein,L (ed),Pentice Hall Englewood Cliffs, New Jersey. p.189 (1967)

TASKA, R.J. und HILLMAN: Effects of actinomycin and cyclohexemide on RNA- and protein-synthesis in cleavage stage mouse embryos. - Nature (Lond.) 225, 1022-1025 (1970)

TIEDEMANN, H.: Embryonale Induktion und Differenzierung: RNS- und Proteinstoffwechsel in Triturusembryonen. - In: Biochemie und Pathochemie des Keimstoffwechsels. Symp.d.Schweizerischen Akad.d.med.Wissenschaften. Schwabe & Co Verlag Basel/Stuttgart (1965) p. 89-96

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. und MERCIER-PAROT, L.: Production de diverses malformations par administration d'actinomycine-D à la ratte gestante. - C.R.Soc.Biol. (Paris) 153, 386-391 (1959, a)

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. und MERCIER-PAROT, L.: A propos de l'action tératogène de l'actinomycine. - C.R.Soc.Biol.(Paris) 153, 1967-1970 (1959, b)

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. und MERCIER-PAROT, L.: The teratogenic action of the antibiotic actinomycin-D. - In: Ciba Found.Symp. on congenital malformations. (ed by J.and A.Churchill) Lond.: p 115 (1960, a)

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. und MERCIER-PAROT, L.: A propos de l'action tératogène de l'actinomycine-D essais de prévention par l'acide pantothenique. - Rev.franc.Etude clin.biol. 5, 823 (1960, b)

- TUCHMANN-DUPLESSIS, H.: The action of anti-tumor drugs on gestation and on embryogenesis. - In: Teratology: (es by A.Bertelli and L. Donati) Amsterdam: Excerpta medica Found. 75-86 (1969)
- UNGER, B. und DICKSON, A.D.: Effect of cyclohexemide and actinomycin-D on the mouse blastocyst undergoing the giant cell transformation. - I.Anat.(Lond.) 108, 3 519-525 (1971)
- VILLEGAS, H. und MERKER, H.J.: Electron microscopic observations on cell surface and cell contact in the decidua of rats days 7-10. - In: I.Symp.d.SFB 29, (1970) im Druck
- WEBER, R.: Biochemische und zellbiologische Aspekte der Gewebsrückbildung in der Entwicklung. - In: Biochemie und Pathochemie des Keimstoffwechsels. Symp.d.Schweizerischen Akad.d.med. Wissensch. Schwabe & Co Verl. Basel/Stuttgart (1965) p. 27-46
- WILSON, J.G.: Effects of acute and chronic treatment with actinomycin on pregnancy and the fetus in the rat. - Harper Hosp.Bull. 24, 109-118 (1966)
- WYNN, R.M.: Electronmicroscopy of the developing decidua. - Fertil.Steril. 16, 16-26 (1965)
- ZIMMERMANN, W. und GOTTSCHIEWSKI, G.H.M.: Die Wirkung bestimmter Substanzen auf die DNS- und Proteinsynthese in der frühen Embryonalentwicklung des Kaninchens. - In: Biochemie u. Pathochemie des Keimstoffwechsels. Symp.d.Schweiz. Akad.d.med.Wissensch.: Schwabe & Co Verl. Basel/Stuttgart (1965) p. 166-183

ABBILDUNGEN

Abb. 1: Kern einer Rattendeciduazelle vom
Tag 10, unbehandelt: Im Karyoplasma
weite, aufgelockerte Zonen (X) und
kleinere Chromatinverdichtungen (✱),
im Centrum großer Nucleolus (No)
mit Verdichtungszone (f) und
Aufhellungen (↑);
E = cytoplasmatische Einstülpung,
V = Vacuole im Nucleolus,
KM = doppelte Kernmembran,
im Cytoplasma Hohlräume des Endo-
plasmatischen Retikulums (ER) und
freier Ribosomen (O).

Vergrößerung: 1:21 000

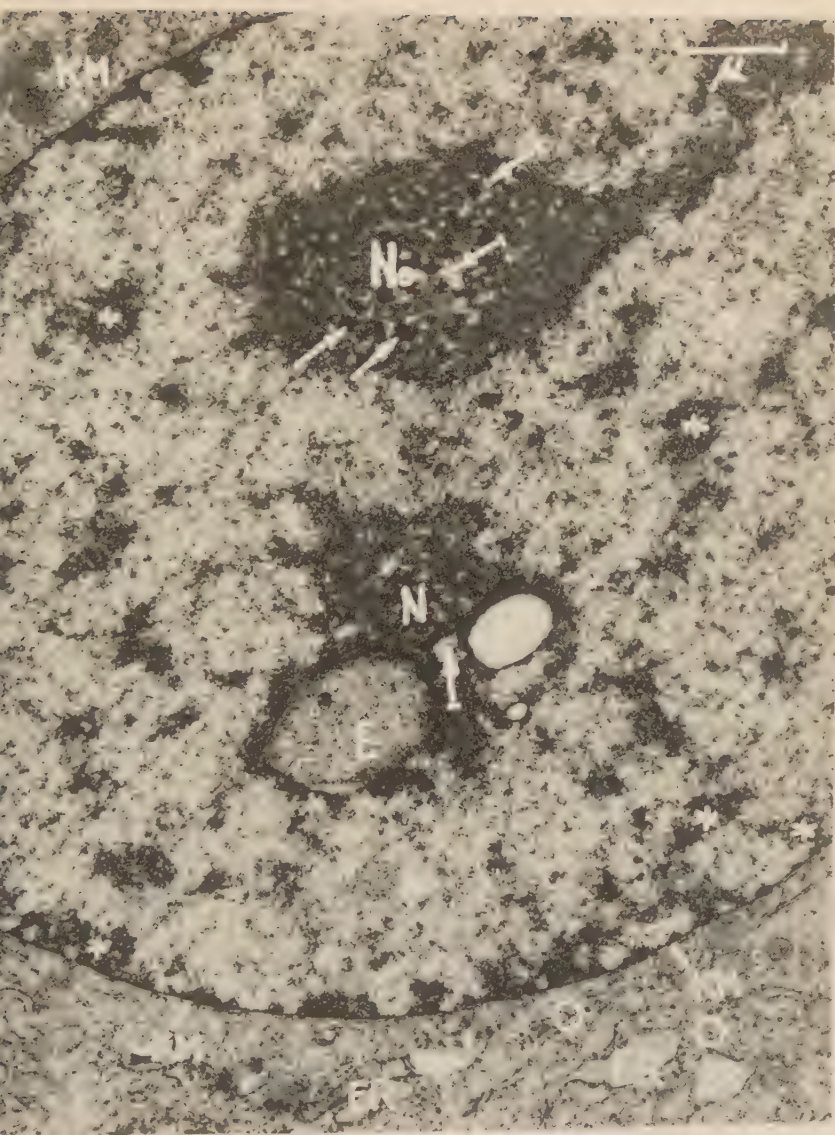


Abb. 2: Rattendecidua des Tages 9, 12 Stunden nach Applikation von 300 mg/kg Actinomycin-D: Im Kern gegenüber dem Kontrollbild deutliche Verdichtungen des Chromatins, Chromatinmaterial nur noch in der Peripherie (↑) des Nucleolus (No) angehäuft, im Cytoplasma noch keine deutlich sichtbaren Veränderungen.

Vergrößerung: 1:28 000



Abb. 3: Rattendecidua des Tages 9, 12 Stunden nach Applikation von 300 mg/kg Actinomycin-D: Verdichtetes Chromatin (X), beginnende Lösung des Chromatins (†) vom Restnucleolus (No).

Vergrößerung: 1:28 000

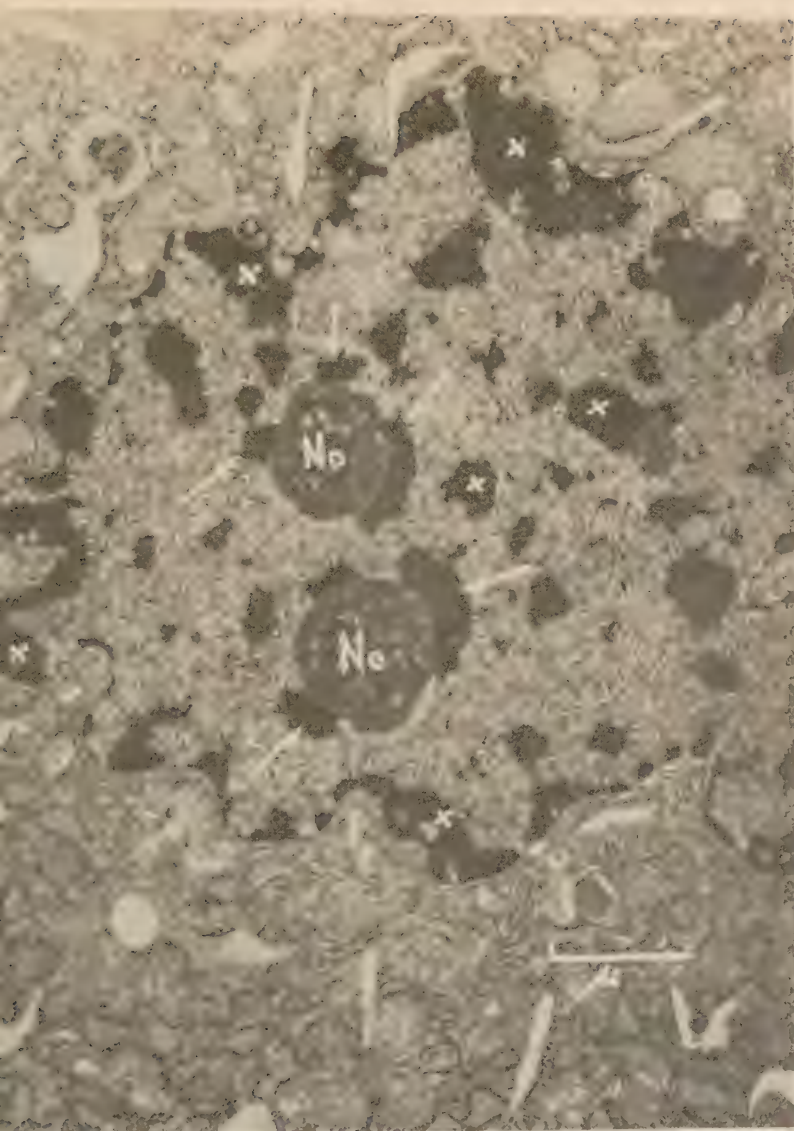


Abb. 4: Rattendecidua des Tages 10, 24 Stunden nach Applikation von 300 mg/kg Actinomycin-D: Verdichtetes Chromatin (X), fast vollständige Lösung des Chromatins (†) vom Restnucleolus (No), im Cytoplasma ausgedehnte Fragmentierung des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (⌘).

Vergrößerung: 1:28 000

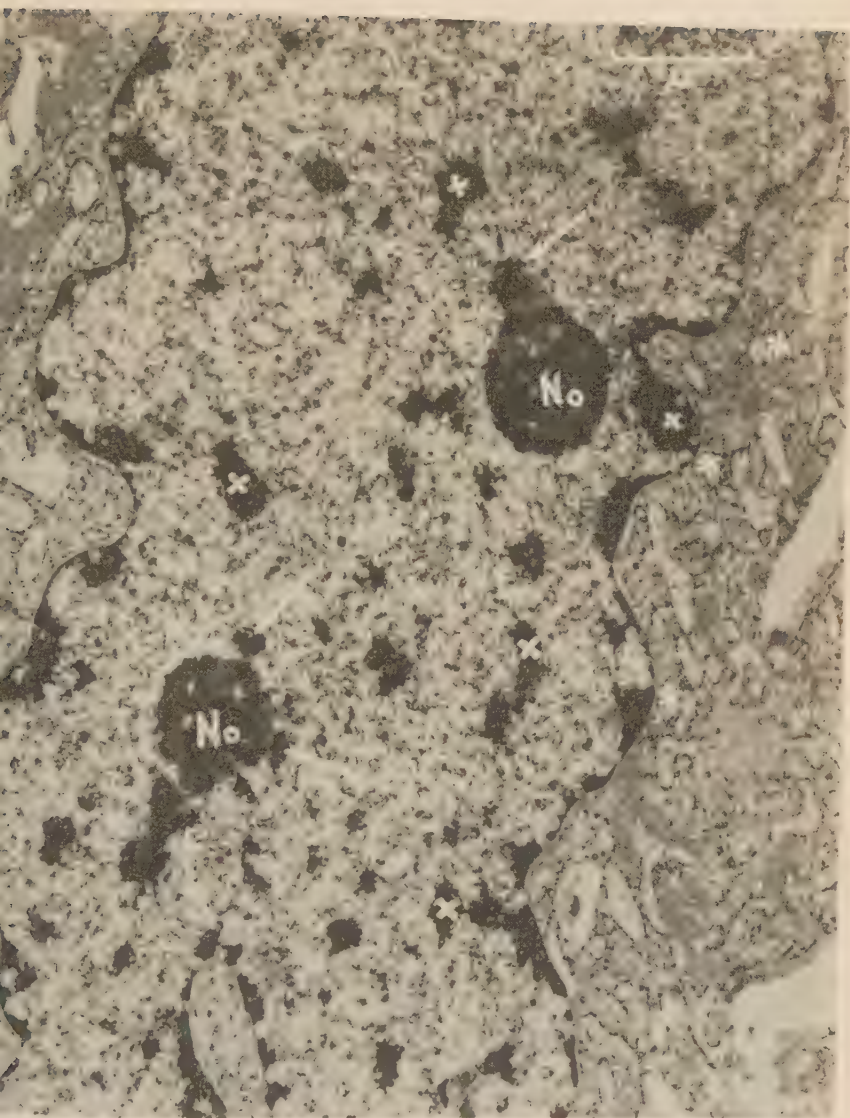


Abb. 5: Rattendecidua des Tages 10, 24 Stunden nach Applikation von 300 mg/kg Actinomycin-D: Verdichtetes Chromatin (X), fast vollständige Lösung des Chromatins (↑) vom Restnucleolus (No).

Vergrößerung: 1:42 000

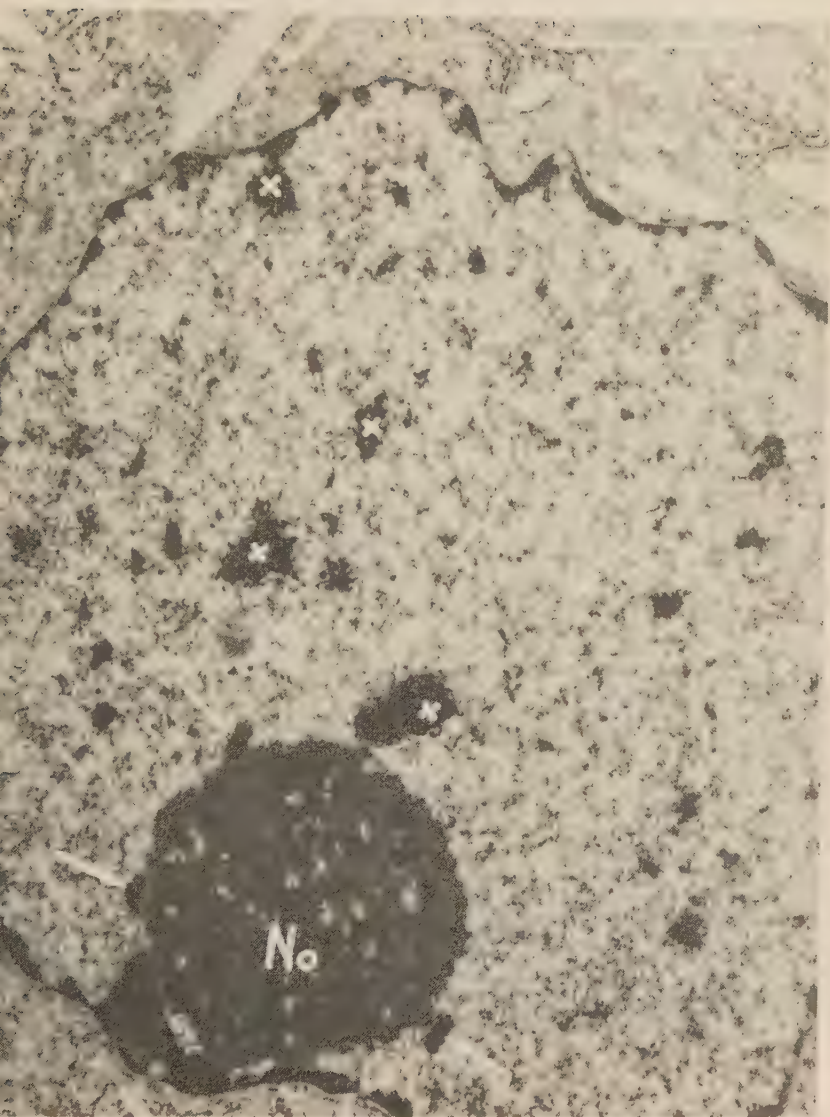


Abb. 6: Unbehandelte Rattendecidua vom Tag 9:
Verzahnung der Zellen untereinander
(*) und epithelähnlicher Zellkon-
takt (†), im Cytoplasma zahlreiche,
langgestreckte Hohlräume des Endo-
plasmatischen Retikulums (X);
O = freie Ribosomen,
Mi = Mitochondrien,
N = Nucleus,
No = Nucleolus.

Vergrößerung: 1:40 000

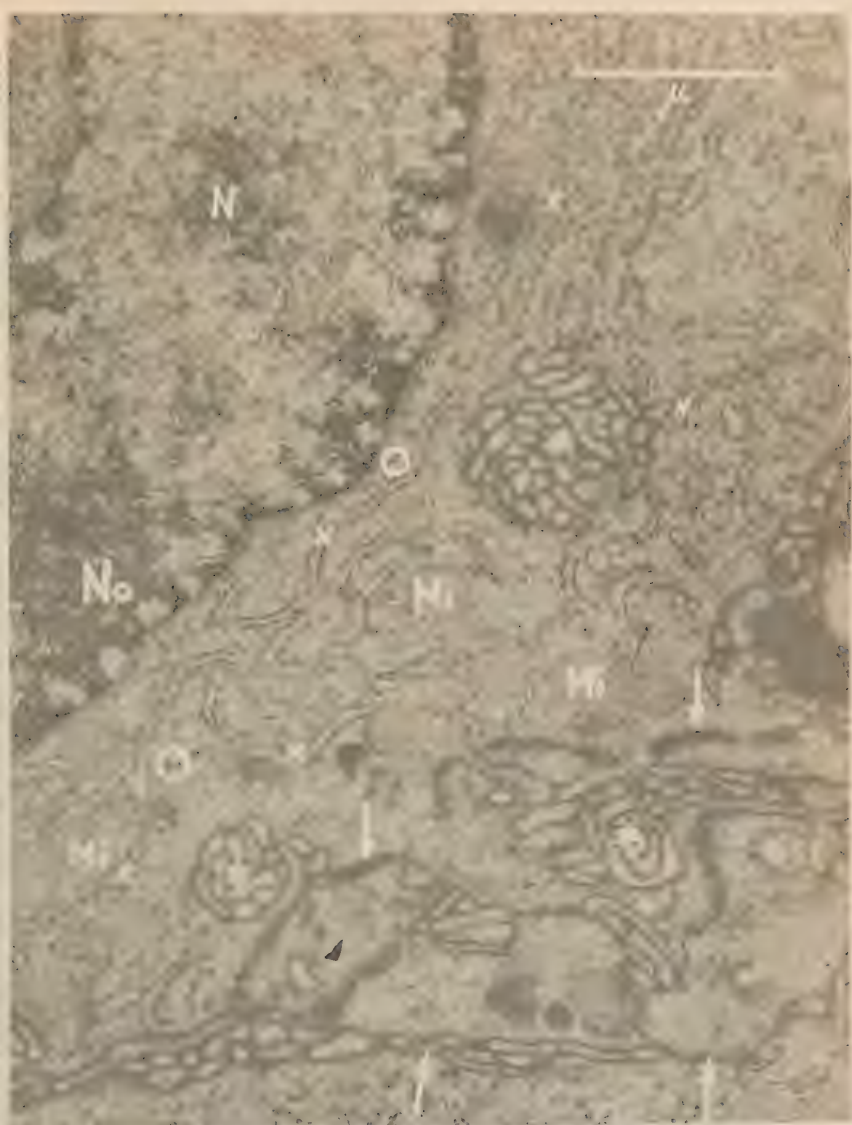


Abb. 7: Rattendecidua des Tages 10, 24 Stunden nach Applikation von 300 mg/kg Actinomycin-D: Noch kein epithel-ähnlicher Kontakt zwischen den Deciduazellen (D), im Interzellularraum (I) noch zahlreiche filamentäre Strukturen.

Vergrößerung: 1:70 000



Abb. 8: Rattendecidua vom Tag 10, 24 Stunden nach Applikation von 300 mg/kg Actinomycin-D: Im Kern noch verdichtete Chromatinbezirke (X), Nucleolus (No) bereits in der Erholungsphase, im Cytoplasma zahlreiche Fragmente des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (†).

Vergrößerung: 1:10 500

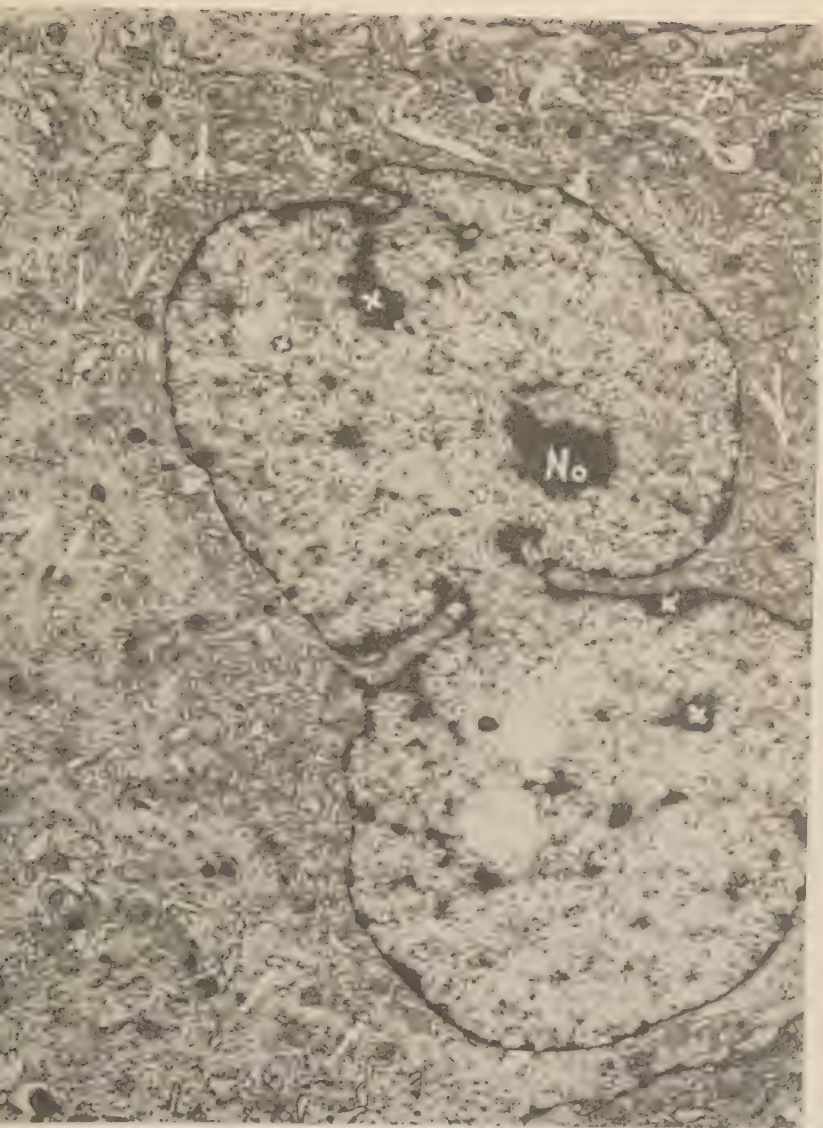


Abb. 9: Rattenembryo des Tages 9, 12 Stunden nach Applikation von 300 mg/kg Actinomycin-D: Ektodermale Zellen (E) und entodermale Zellen (EN), A = Amnionhöhle, in den großen aufgelockerten Kernen riesige Nucleonemata.

Vergrößerung: 1:8 400



Abb. 10: Höhere Vergrößerung des in Abbildung 9 mit einem Pfeil gekennzeichneten Kernes.

Vergrößerung: 1:35 000



Herrn Professor Dr. med. H.J. Merker danke ich
herzlich für die Überlassung des Themas und
für die freundliche Unterstützung bei der
Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch den Assistentinnen und
Mitarbeitern des Anatomischen Institutes der
Freien Universität Berlin, die mir bei der
technischen Vorbereitung eine große Hilfe
waren.

Lebenslauf

Am 20. April 1945 wurde ich, Gernot G. STEFAN als Sohn des Realschulrektors Frans STEFAN und seiner Ehefrau Pauline in Landskron/Böhmen geboren.

Meine Kindheit erlebte ich ab meinem 1. Lebensjahr in Kitzingen/Main, wo ich 1951 eingeschult wurde. 1957 nahm die Familie ihren neuen Wohnsitz in Würzburg. Dort besuchte ich die Röntgen-Oberrealschule und legte im Juni 1965 die Reifeprüfung ab.

Das Medizinstudium absolvierte ich, mit Ausnahme des Sommersemesters 1969, das ich an der Christian-Albrechts-Universität Kiel verbrachte, an der Freien Universität Berlin und bestand hier am 24.2.1972 das Staatsexamen.

Anschließend arbeitete ich in der Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der FU Berlin und fertigte unter der Leitung von Prof. Dr. H.J. Merker die vorliegende Dissertation an.

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin

- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31

